

⑯ BUNDESREPUBLIK  
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES  
PATENTAMT

⑯ Offenlegungsschrift  
⑯ DE 41 32 379 A 1

⑯ Aktenzeichen: P 41 32 379.3  
⑯ Anmeldetag: 28. 9. 91  
⑯ Offenlegungstag: 8. 4. 93

⑯ Int. Cl. 5:  
**C 12 M 3/00**  
G 02 B 21/34  
C 12 N 11/08  
// C12Q 1/18,1/00,  
C12N 5/06,C08J  
5/18,C08L 33:12

DE 41 32 379 A 1

⑯ Anmelder:  
Kernforschungszentrum Karlsruhe GmbH, 7500  
Karlsruhe, DE

⑯ Erfinder:  
Weibezahn, Karl Friedrich, Dr., 7513 Stutensee, DE;  
Knedlitschek, Gudrun, Dr., 7500 Karlsruhe, DE;  
Dertinger, Hermann, Prof. Dr., 6900 Heidelberg, DE;  
Schubert, Klaus, Dr., 7500 Karlsruhe, DE; Bier,  
Wilhelm, Dr., 7514 Eggenstein-Leopoldshafen, DE;  
Schaller, Thomas, 7504 Weingarten, DE

Prüfungsantrag gem. § 44 PatG ist gestellt

⑯ Substrat für Zellkulturen und Kultur von Zellen oder Zellaggregaten

⑯ Die Erfindung betrifft ein Substrat für Zellkulturen, bestehend aus einem mikrostrukturierten plattenförmigen Körper, der zur Aufnahme von Zellen oder Zellaggregaten eine Vielzahl von durch Stege voneinander getrennte Vertiefungen enthält, deren größter Durchmesser und deren Tiefe jeweils ein Mehrfaches des Durchmessers der Zellen oder Zellaggregate beträgt und die an ihrem Grund jeweils mindestens eine Öffnung aufweisen, die kleiner ist als die kleinste der von den Vertiefungen aufzunehmenden Zellen oder Zellaggregaten sowie eine mit diesem Substrat angelegte Zellkultur. Der Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, ein Substrat vorzuschlagen, mit dessen Hilfe eine dreidimensionale Zellkultur angelegt werden kann.

DE 41 32 379 A 1

## Beschreibung

Die Erfindung betrifft ein Substrat für Zellkulturen, bestehend aus einem mikrostrukturierten plattenförmigen Körper, der zur Aufnahme von Zellen oder Zellaggregaten eine Vielzahl von durch Stege voneinander getrennte Vertiefungen enthält, deren größter Durchmesser und deren Tiefe jeweils ein Mehrfaches des Durchmessers der Zellen oder Zellaggregate beträgt und die an ihrem Grund jeweils mindestens eine Öffnung aufweisen, die kleiner ist als die kleinste der von den Vertiefungen aufzunehmenden Zellen oder Zellaggregate sowie eine dreidimensionale Kultur von Zellen oder Zellaggregaten mit einem Substrat in Form einer Gitterstruktur mit wabenartig angeordneten, durch Stege mit zur Gitterebene senkrechten oder geneigten Wänden getrennten Durchbrüchen, deren Durchmesser und Tiefe ein Mehrfaches des Durchmessers der Zellen oder Zellaggregate beträgt, wobei die Zellen oder Zellaggregate an den Wänden der Stege haften.

Aus der Veröffentlichung "Morphologische Untersuchungen an Eileiterepithelzellen des Kaninchens: Primärkulturen auf Polycarbonatmembranen" von I. G. Noske in TECNOMARA NEWS IV/90, Labortechnische Informationsschrift ist ein zweidimensionales Substrat für Zellkulturen und eine zweidimensionale Zellkultur bekannt. Das Substrat besteht aus einer Membran, die Poren unterschiedlicher Größe aufweist. Einige dieser Poren durchdringen die Membran. Die Zellen zeigen eine Tendenz, sich in diesen Poren zu verankern. Im wesentlichen bildet die Zellkultur eine Monoschicht, die die Oberseite und die Unterseite der Membran bedeckt.

Solche Substrate haben den Vorteil, daß Nährlösung den Zellen ungehindert zugeführt und Stoffwechselprodukte leicht abtransportiert werden können. Ferner besteht die Möglichkeit, auf solchen Substraten haftende Zellen optisch unter dem Mikroskop zu kontrollieren. Als Fazit der Veröffentlichung ist jedoch angeführt, daß die Zellen sich in Abhängigkeit vom angebotenen Substrat in ihrer Form verändern. So wachsen sie auf Glas- oder Plastikunterlage oft extrem flach, so daß die für ihre Funktion so wichtige Polarität nicht gewährleistet ist.

Aus den Veröffentlichungen "Solid tissue masses formed in vitro from cells cultured on artificial capillaries" von Richard A. Knazek, Federation Proceedings Vol. 33, No. 8 (August 1974) und einem Firmenprospekt der Firma "dunn Labortechnik GmbH" in Asbach, DE, mit dem Titel "Cellmax™ 100 — Hollow Fiber Bioreactor System for Mammalian and Insect Cell Culture", der auf die Veröffentlichung Knazek bezug nimmt, ist ein Zellsubstrat bekannt, das aus einer Vielzahl parallel verlaufender Kapillaren besteht, die im Abstand voneinander angeordnet sind. Die Kapillaren sind an ihren Enden durch jeweils ein Abschlußstück zusammengefaßt, mit dem Nährlösung durch die Kapillaren geleitet werden kann. Die Zellen wachsen an der Außenseite der Kapillaren in dem Zwischenraum, den sie untereinander bilden, auf. Die Nährlösung diffundiert aus dem Innern der Kapillaren durch die Kapillarwand in den Zwischenraum und versorgt hier die Zellen. Auf diese Weise kann eine dreidimensionale Zellstruktur erzeugt werden.

Dieses Substrat erscheint aus verschiedenen Gründen zur Anlage und Untersuchung von Zellkulturen weniger geeignet. Der Stoffwechselgradient ist wegen der unregelmäßigen Geometrie nicht eindeutig definiert. Ferner wird die Diffusion von Produkten durch die Konstruk-

tion der verschiedenen Kapillaren in Abhängigkeit vom verwendeten Material immer auf bestimmte Molekulargewichte eingeschränkt. Für manche Anwendungen ist eine Beschichtung des Substrats notwendig; eine solche Beschichtung kann bei diesem Zellsubstrat als Diffusionssperre wirken und damit einen Gradienten zusammenbrechen lassen. Schließlich kann das bekannte Substrat nicht so ausgebildet werden, daß eine mikroskopische Kontrolle der Zellen während der Kultivierung möglich ist.

Der Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, den genannten Nachteilen der bekannten Zellsubstrate abzuheben. Insbesondere sollen die Vorteile von membranartigen Substraten mit der Möglichkeit, dreidimensionale Zellstrukturen auszubilden zu können, kombiniert werden.

Die Aufgabe wird durch das eingangs beschriebene Substrat für Zellkulturen und durch die eingangs beschriebene Zellkultur gelöst. Die abhängigen Ansprüche geben besonders vorteilhafte Ausführungsformen des Substrats an.

Erfahrungsgemäß wird ein Substrat für Zellkulturen vorgeschlagen, das aus einem mikrostrukturierten plattenförmigen Körper besteht, der eine Vielzahl von durch Stege voneinander getrennte Vertiefungen enthält. Der größte Durchmesser und die Tiefe der Vertiefungen wird so gewählt, daß sie jeweils einem Mehrfachen des Durchmessers derjenigen Zellen oder Zellaggregate entsprechen, für die das Substrat vorgesehen ist. Die Vertiefungen weisen an ihrem Grund jeweils mindestens eine Öffnung auf, die kleiner ist als die kleinste der von den Vertiefungen aufzunehmenden Zellen oder Zellaggregate, so daß die Zellen auf einfache Weise in die Vertiefungen eingebracht werden können, indem auf das Substrat von der Seite, die die großen Öffnungen aufweist, eine Zellsuspension aufgebracht wird. Auf diese Weise werden die Zellen in den Vertiefungen festgehalten und können sich an deren Wänden verankern.

Das erfahrungsgemäße Substrat stellt vorzugsweise einen plattenförmigen Körper dar, der in der Art einer Gitterstruktur beispielsweise quadratische Vertiefungen enthält, die dicht nebeneinander angeordnet sind und sich in Form eines Pyramidenstumpfs nach unten verjüngen. Auf den Grundflächen der Vertiefungen sind weitere, wesentlich kleinere pyramidenförmige Vertiefungen angebracht, wobei die Spitzen der pyramidenförmigen Vertiefungen den plattenförmigen Körper durchstoßen.

Eine weitere Ausführungsform des erfahrungsgemäßen Substrats besteht darin, daß eine gitterförmige Struktur auf eine mikroporöse Bodenplatte aufgesetzt ist. Hierbei ist es unerheblich, ob die Stege des Gitters zur Gitterebene senrecht oder geneigt angeordnet sind. Als Bodenplatte kann eine für Flüssigkeiten durchlässige Membran verwendet werden, die die Zellen zurückhält. Die Membran kann aus einem organischen Polymer oder Copolymer bestehen; als Bodenplatte ist jedoch auch eine keramische Fritte geeignet.

Eine Bodenplatte mit einer oder mehreren Öffnungen, die kleiner sind als die kleinste der von den Vertiefungen aufzunehmenden Zellen oder Zellaggregate, ist nur anfangs notwendig, wenn die Zellkultur angelegt wird. Nach einiger Zeit haften die Zellen an den Wänden der Vertiefungen und bilden gewebeartige dreidimensionale Zellaggregate aus, wobei die Zellen mit den an den Wänden haftenden Zellen aggregieren. Mikroskopische Untersuchungen können vereinfacht werden.

wenn die Bodenplatte nach der Anlage der Zellkultur vom Gitter gelöst werden kann.

Als Werkstoffe für das Substrat sind vor allem durchsichtige Materialien geeignet. Vorzugsweise besteht das Substrat aus Polymethylmethacrylat (PMMA). Für den Fall, daß das Substrat aus einem Gitter und einer vom Gitter lösbarer mikroporösen Bodenplatte aufgebaut ist, reicht es aus, wenn nur das Gitter aus einem durchsichtigen Material gefertigt ist.

Das erfundungsgemäße Substrat kann in einen Mikroskop-Objektträger integriert werden.

Durch dreidimensionale Kultivierung der Zellen im erfundungsgemäßen Substrat erfolgt Zelldifferenzierung zusätzlich zu den Substratkontakten über Zell-zu-Zell-Interaktionen. Neben der mikroskopischen Beobachtung können Serien-Dünn schnitte des mit Zellen gefüllten Substrates angefertigt werden, ein für die Anwendung histologischer und histochemischer Methoden entscheidender Vorteil.

Das erfundungsgemäße Substrat kann in einen Objektträger ebenso wie in ein Medium-Zirkulationssystem integriert werden. Bei mehrlagiger randdichter Ausfüllung mit Zellen stellt das Substrat eine Art Gewebefilter dar, wodurch zwei physiologische Halbräume oberhalb und unterhalb desselben definiert werden. Durch unterschiedliche Mediumbeschickung im Zirkulations system bilden sich vertikal gerichtete Stoffwechselgradienten in der Kultur aus, die auch durch eine zusätzliche Beschichtung der Gitterelemente (z. B. mit Komponenten der Extrazellulärmatrix im Zuge zellspezifischer Anwendungen) nicht blockiert oder behindert werden.

Das erfundungsgemäße Substrat stellt eine stabile Stützstruktur für Zellen dar und ermöglicht die Herstellung von definierten Schichten aus verschiedenen Zelltypen. Durch die hierbei auftretenden heterotypischen Zellinteraktionen kann es zu weiteren Differenzierungsvorgängen kommen. Mit solchen Systemen können beispielsweise zellspezifische Transportprozesse studiert werden. Speziell könnten die *in vitro* nur schwer restituierbaren Bedingungen des Organsystems Haut näher untersucht werden, indem ein Halbraum von Luft anstelle von Medium durchströmt wird.

Eine solche "organnahe" Kulturtechnik auf der Basis des erfundungsgemäßen Substrates ist auf eine große Zahl verschiedenartiger Zelltypen anwendbar. Sie kann für Fragestellungen aus zahlreichen biomedizinischen Gebieten eingesetzt werden, bei denen ein Höchstmaß an Zelldifferenzierung erforderlich ist:

- Für toxikologische Untersuchungen zur Erzielung wirklichkeitsnäher Ergebnisse.
- Bei der Entwicklung von Arzneimitteln: Wirkungs- und Abbaustests.
- In der Grundlagenforschung.
- Als Alternative zum Tierexperiment, vor allem bei der Untersuchung komplizierter Organsysteme (z. B. Leber oder Haut).

Die Erfindung wird im folgenden anhand von Figuren und Ausführungsbeispielen näher erläutert.

**Fig. 1** zeigt eine Ausführungsform mit quaderförmigen Vertiefungen 1, die durch senkrechte Stege 2 voneinander getrennt und nach unten durch eine poröse Bodenplatte 3 abgeschlossen sind.

**Fig. 2** zeigt die Ausführungsform gemäß **Fig. 1** und eine abgewandelte Ausführungsform mit V-förmigen Stegen im Querschnitt.

Die **Fig. 3** bis **5** zeigen verschiedene Bearbeitungsschritte eines Formeinsatzes, mit dem eine Ausführungsform des erfundungsgemäßen Substrats abgeformt werden kann.

5 **Fig. 3** stellt den vorbearbeiteten Formeinsatz dar.  
In **Fig. 4** ist der grobstrukturierte Forminsatz dargestellt.

**Fig. 5** zeigt den feinstrukturierten Formeinsatz.

10 **Fig. 6** zeigt mit dem grobstrukturierten Formeinsatz abgeformte Stege aus PMMA.

**Fig. 7** zeigt mit dem feinstrukturierten Formeinsatz abgeformte Stege mit kleinen Einsenkungen am Grund der durch die Stege gebildeten Vertiefungen, aus denen die Öffnungen hergestellt werden.

15 **Fig. 8** zeigt die durch Fräsen bearbeitete Unterseite des Substrats mit den Öffnungen.

**Fig. 9** stellt die Oberseite des in **Fig. 8** gezeigten Substrats dar.

20 **Fig. 10** zeigt einen Mikroskop-Objektträger, in den das Substrat integriert ist.

**Fig. 11** zeigt einen weiteren Mikroskop-Objektträger mit integriertem Substrat.

#### Beispiel 1

##### Herstellung einer Ausführungsform des erfundungsgemäßen Substrats

Die erfundungsgemäßen Substrate können durch 30 Röntgenlithographie-Verfahren oder durch Abformverfahren hergestellt werden. Im folgenden wird anhand der **Fig. 3** bis **8** ein Abformverfahren beschrieben, mit dem auf einfache Weise eine Vielzahl der erfundungsgemäßen Substrate in Serie hergestellt werden können.

35 Zur Abformung eines Substrats aus Kunststoff wird ein Formeinsatz benötigt, in den die Positiv-Strukturen der Vertiefungen und Öffnungen des mikrostrukturier ten Substrats eingebracht sind.

40 **Fig. 3** zeigt einen vorbearbeiteten Formeinsatz mit vier erhabenen Plateaus von  $10 \text{ mm} \times 10 \text{ mm}$  in den Bereichen 1 bis 4. Die Höhe der Plateaus beträgt 1 mm. In jedes Plateau werden mit einem keilförmig profilierten Diamanten kreuzweise Nuten derart eingebracht, daß 45 im Rastermaß  $400 \mu\text{m}$  quadratische Netze aus  $280 \mu\text{m}$  tiefen Gräben mit dreieckigem Querschnitt entstehen. Dadurch bleiben Pyramidenstümpfe mit Deckflächen von  $300 \mu\text{m} \times 300 \mu\text{m}$  stehen. Diese grobstrukturierte Form des Formeinsatzes ist in **Fig. 4** dargestellt.

50 Danach werden in den Bereichen 1 bis 4 in die Pyramidenstümpfe durch erneute kreuzweise Bearbeitung mit feineren Diamanten eine Substruktur eingebracht: Die Deckfläche eines jeden Pyramidenstumpfs wird im Raster  $40 \mu\text{m}$  durch  $8 \times 8$  Mikropyramidenstümpfe strukturiert. Die Höhe der Mikropyramidenstümpfe liegt bei  $80 \mu\text{m}$ , die Deckflächen messen einige  $10 \mu\text{m}^2$ . Das Ergebnis dieses Bearbeitungsschritts ist in **Fig. 5** dargestellt.

55 Der auf diese Weise bearbeitete Formeinsatz wird mit Hilfe einer Spritzgießmaschine abgeformt. **Fig. 6** und **7** zeigen Grob- und Feinstruktur des in PMMA abgeformten Werkzeugs.

In einem abschließenden Bearbeitungsschritt wird das unter den abgeformten Strukturen befindliche Material entfernt; durch diesen Schritt werden die Öffnungen am Boden des Substrats freigelegt. Hierzu wird das Substrat auf einer Vakuumspannvorrichtung fixiert und solange Material von der Unterseite des Substrats ent-

fernt, bis die Öffnungen bzw. Poren des Bodens offen zutage treten. Über das Maß des Abtrags läßt sich die Dicke des Bodenteils und der minimale Poredurchmesser steuern. Das Ergebnis dieses Verfahrensschritts ist in den Fig. 8 (Unterseite des Substrats) und 9 (Oberseite des Substrats) dargestellt. Wird der Boden des Substrats vollständig entfernt, läßt sich ein Kunststoffgitter aus 100 µm breiten Stegen mit Maschenweiten von 300 µm herstellen.

#### Beispiel 2

##### Herstellung eines Mikroskop-Objektträgers

Ein gemäß Beispiel 1 hergestelltes Substrat 2 mit einer benutzbaren Fläche von 10 mm × 10 mm wird, wie in Fig. 10 gezeigt, mit zwei Glasobjektträgerplättchen 3, Justierscheiben 3 und Zwischenscheiben 4, die Thermostatisierungs- und Nährlösungskanäle 5 enthalten, zu einem Objektträger vereinigt.

Die äußeren Kanäle dienen der Thermostatisierung; über die mittleren Kanäle wird Nährlösung zu- und abgeleitet.

#### Beispiel 3

##### Herstellung eines weiteren Mikroskop-Objektträgers

Der Mikroskop-Objektträger besteht aus zwei nahezu identischen Zwischenscheiben 10, 11, zwischen denen ein gemäß Beispiel 1 hergestelltes Substrat 2 flüssigkeitsdicht eingespannt werden kann. Die obere 10 und untere 11 Zwischenscheibe sind bis auf den Unterschied identisch, daß die obere seitlich vier Bohrungen 12 und die untere an den entsprechenden Stellen vier Gewinde (nicht dargestellt) enthält, durch die mittels Schrauben das dazwischenliegende Substrat 2 eingeklemmt wird. Die Zwischenscheiben sind aus Messing gefertigt und oberflächlich durch eine galvanisch aufgebrachte Schicht aus Rhodium für die Gewebekultur veredelt. Die jeweilige Außenfläche ist mit einer rechteckigen Einfräzung der Breite versehen, daß sie ein handelsübliches Mikroskop-Objektträgerplättchen 14 aufnehmen kann, das durch jeweils zwei an den kurzen Außenkanten befindliche Kunststoffschauben (in den Bohrungen 15) arretiert wird. Die Zwischenscheiben sind mit einer zentralen Bohrung 16 versehen, durch die eine optische Beobachtung der Zellen im Substrat möglich ist.

Auf der Innenseite befindet sich eine kreisförmige Einfräzung 20, die der paßgenauen Aufnahme des Substrats dient.

Zwei äußere durchgehende Rohre 17 (Innendurchmesser 3 mm, Außendurchmesser 4 mm) können über den Anschluß an ein externes Wasserbad mit Warmwasser zur Temperierung durchströmt werden. Mittlere Rohre 18, 19 ragen von gegenüberliegenden Seiten in die zentrale Bohrung 16 hinein. Durch diese wird frisches Nährmedium durch den Hohlraum geleitet, der an der mittleren Fläche durch das Substrat 2 und an der äußeren Fläche durch das jeweilige Objektträgerplättchen 14 begrenzt ist. Dadurch entstehen im zusammengebauten Zustand zwei Hohlräume, die von unterschiedlichen Nährmedien durchströmt werden können.

Das gesamte System ist somit von oben nach unten symmetrisch durch die folgenden Komponenten aufgebaut:

Objektträgerplättchen 14, verschraubt an die obere Zwischenscheibe 10, verschraubt unter Zwischenlage

des Substrats mit der unteren Zwischenscheibe 11, an der ein weiteres Objektträgerplättchen 14' verschraubt ist.

Mit den gemäß Beispiel 1 hergestellten Substraten wurden im folgenden biologische Versuche durchgeführt, um die Kultivierung dreidimensionaler Zellkulturen zu demonstrieren.

#### Beispiel 4

##### Beschickung des Substrats mit Zellen

Die Experimente wurden mit zwei permanenten Zelllinien der Maus durchgeführt: L- und SV40-3T3-Zellen.

Es kamen durchweg Standard-Kulturmedien zum Einsatz.

Zunächst wurden die Substrate durch Co-Gammabestrahlung mit ca. 100 Gy sterilisiert und in eine trockene Petrischale überführt. Auf die 1 cm<sup>2</sup> große Gitterfläche wurden 300 bis maximal 400 µl einer konzentrierten Suspension von Zellen bzw. Sphäroiden (Zellaggregat) aufgetragen. Durch die Kapillarwirkung kam es zu einem raschen Eindringen in die Vertiefungen des Substrats innerhalb von ca. einer Minute unter vollständiger Mitnahme der Zellen oder Sphäroide. Nach ca. 15 Minuten im Brutschrank bei 37°C wurde die Petrischale vorsichtig mit Medium gefüllt, wobei zwei Varianten erprobt wurden. Einmal wurde die Gitterstruktur unterschichtet, so daß sie auf dem Mediumfilm schwamm. Alternativ wurde sie überschichtet. In beiden Fällen etablierte sich ein vollständiger Kontakt des Mediums mit den Zellen im Substrat; beide Varianten erwiesen sich als gleichwertig in Bezug auf die weitere Kultivierung der Zellen im Brutschrank. Die Beschickung des Substrats ist insgesamt problemlos; auf eine zusätzliche vorsichtige Zentrifugierung zur Verbesserung des Eindringens der Zellen bzw. Sphäroide kann im allgemeinen verzichtet werden.

#### Beispiel 5

##### Zur Gewebefreundlichkeit des verwendeten Kunststoffs PMMA

Ein weiteres Testziel bestand in der Untersuchung der Gewebefreundlichkeit des Substratmaterials. Als Kriterium wurde hier die Ausbildung von mikroskopisch sichtbaren Kontakten mit den Wänden herangezogen. Es zeigte sich, daß es innerhalb weniger Stunden zur Anheftung der Zellen an den Wänden der Vertiefungen des Substrats kommt. Zusammen mit Vitalitätstests und weiteren Details der Zellwechselwirkung mit den Gitterwänden wird damit die Gewebeverträglichkeit des Substratmaterials PMMA und der Geometrie der Substratstruktur demonstriert. Die beobachtete hohe Affinität der Zellen zum Material wird möglicherweise durch die Vorbestrahlung zur Sterilisierung begünstigt. Die hierbei auftretenden Oberflächenveränderungen (Veränderung des Ladungsmusters) können die Ausbildung von Zellkontakten erleichtern.

#### Beispiel 6

##### Vitalität und Wachstumsverhalten der Zellen

Das Testziel bestand zum einen darin, etwaige zellschädigende Wirkungen bei der Langzeitkultur im Substrat zu identifizieren. Zum andern sollte das Wechsel-

wirkungsmuster der Zellen mit den Gitterwänden und ihre morphologische Differenzierung untersucht werden. Um zellschädigende Wirkungen zu identifizieren, wurden Zellen und Sphäroide in den Gitterstrukturen über mehr als 2 Wochen kultiviert. Die Nährstoffversorgung erfolgte durch Mediumwechsel alle 2 bis 3 Tage. Während dieser Zeit blieb die Kultur steril, die Zellen lebens- und teilungsfähig. Beim Abbruch der Versuchsreihen waren noch alle Zellen vital (Nachweis durch Trypanblau-Ausschlußtest) und teilungsfähig (Klonogenitätstest). Von dem Kultursystem gehen damit, selbst bei Langzeitkultur, keinerlei zellschädigende Wirkungen aus.

Zur Herstellung und Kultur mehrlagiger Zellschichten in den Vertiefungen des Substrats kann man von Einzelzellen oder bereits fertigen Sphäroiden ausgehen. Die Wahl wird in der Praxis nach den Eigenschaften der verwendeten Zellarten, z. B. nach ihrer proliferativen Kapazität, getroffen.

Bei der Einbringung von Einzelzellen kommt es zunächst zur Anheftung an die Wände der Vertiefungen und zwar meist selektiv etwa in der Mitte der Wände, d. h. auf halber Wandhöhe. Eine Besiedlung des porösen Bodens der Vertiefungen findet nur in geringem Umfang statt. Von den Wänden ausgehend vermehren sich die Zellen ohne mechanische Unterstützung zur Mitte der Vertiefungen hin. Es entsteht ein mehrlagiges dichtes Zellgeflecht. Dieses Verhalten hängt in gewissem Umfang vom Typus der eingesetzten Zellen ab und war bei den L-Fibroblasten besonders ausgeprägt.

Zur Untersuchung des Verhaltens von Sphäroiden wurden die Vertiefungen mit SV40-3T3-Sphäroiden mit einem mittleren Durchmesser von 200 µm beschickt. Sie waren damit kleiner als die Vertiefungen, so daß ihr Wachstumsverlauf verfolgt werden konnte. Sie lagen sich zunächst jeweils an eine Wand der Vertiefungen an. Die Zellvermehrung führte zu einer Volumenzunahme der Sphäroide, so daß diese nach wenigen Tagen die Vertiefungen randdicht ausfüllten. Die Kontaktbildung der äußeren Sphäroidzellen mit den Substratwänden und damit die Ausbildung eines mehrschichtigen gewebeartigen Zellverbands konnte mikroskopisch nachgewiesen und verfolgt werden.

#### Beispiel 7

45

#### Ablösung der Zellen zur Analyse; Wiederverwendbarkeit der Substrate

Die in den Vertiefungen verankerten Zellen können mit Hilfe einer enzymatischen Behandlung mit Trypsin herausgelöst und weiter analysiert werden. Die lichtmikroskopische Inspektion zeigt, daß die Zellen dabei quantitativ aus den Vertiefungen entfernt werden. Auch eine einwöchige Inkubation des geleerten Substrats mit frischem Kulturmedium ergab, daß keine Zellen in den Vertiefungen verblieben. Gleichzeitig konnte damit die Aufrechterhaltung der Sterilität dokumentiert werden. Auf diese Art "gereinigte" Substrate sind wiederholt einsetzbar.

60.

#### Patentansprüche

1. Substrat für Zellkulturen, bestehend aus einem mikrostrukturierten plattenförmigen Körper, der zur Aufnahme von Zellen oder Zellaggregaten eine Vielzahl von durch Stege voneinander getrennte Vertiefungen enthält, deren größter Durchmesser

und deren Tiefe jeweils ein Mehrfaches des Durchmessers der Zellen oder Zellaggregate beträgt und die an ihrem Grund jeweils mindestens eine Öffnung aufweisen, die kleiner ist als die kleinste der von den Vertiefungen aufzunehmenden Zellen oder Zellaggregaten.

2. Substrat nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Stege ein Gitter mit pyramidenstumpfförmigen Vertiefungen bilden.
3. Substrat nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß der plattenförmige Körper aus einem Gitter mit zur Gitterebene senkrechten oder geneigten Stegen aufgebaut ist, das auf eine mikroporöse Bodenplatte aufgesetzt ist.
4. Substrat nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, daß die Bodenplatte lösbar mit dem Gitter verbunden ist.
5. Substrat nach einem der Ansprüche 2 bis 4, dadurch gekennzeichnet, daß das Gitter aus einem durchsichtigen Material hergestellt ist.
6. Substrat nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, daß das durchsichtige Material Polymethylmethacrylat (PMMA) darstellt.
7. Substrat nach Anspruch 5 oder 6, dadurch gekennzeichnet, daß das Gitter einen Teil eines Mikroskop-Objekträgers darstellt oder als Mikroskop-Objektträger ausgebildet ist.
8. Dreidimensionale Kultur von Zellen oder Zellaggregaten mit einem Substrat in Form einer Gitterstruktur mit wabenartig angeordneten, durch Stege mit zur Gitterebene senkrechten oder geneigten Wänden getrennten Durchbrüchen, deren Durchmesser und Tiefe ein Mehrfaches des Durchmessers der Zelle oder Zellaggregaten beträgt, wobei die Zellen oder Zellaggregaten an den Wänden der Stege haften.

---

Hierzu 7 Seite(n) Zeichnungen

---

Fig. 1

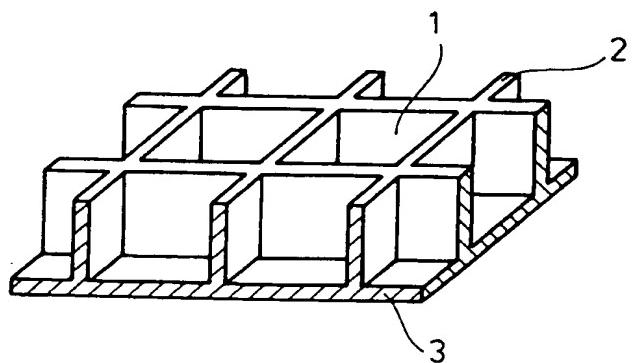
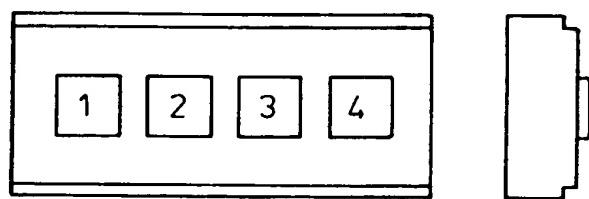


Fig. 2



Fig. 3



Nummer:

**DE 41 32 379 A1**

Int. Cl. 5:

**C 12 M 3/00**

Offenlegungstag:

8. April 1993

Fig. 4

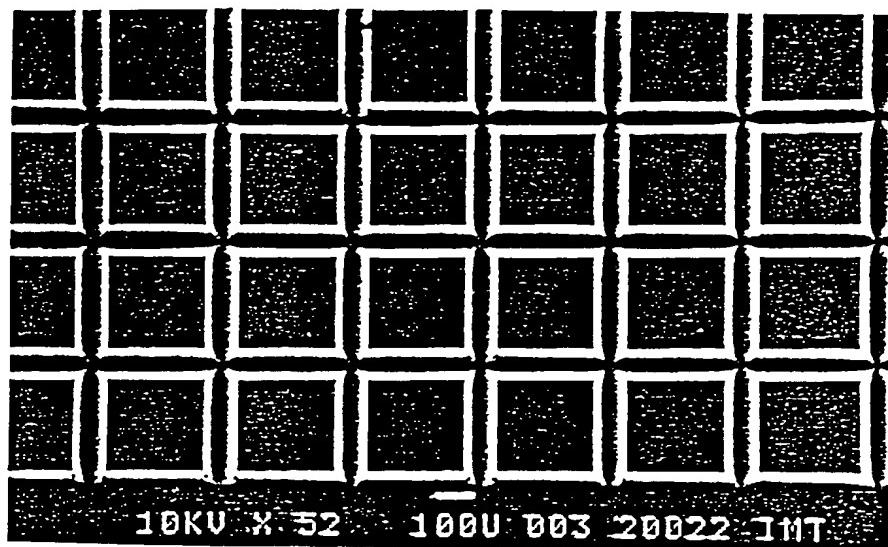
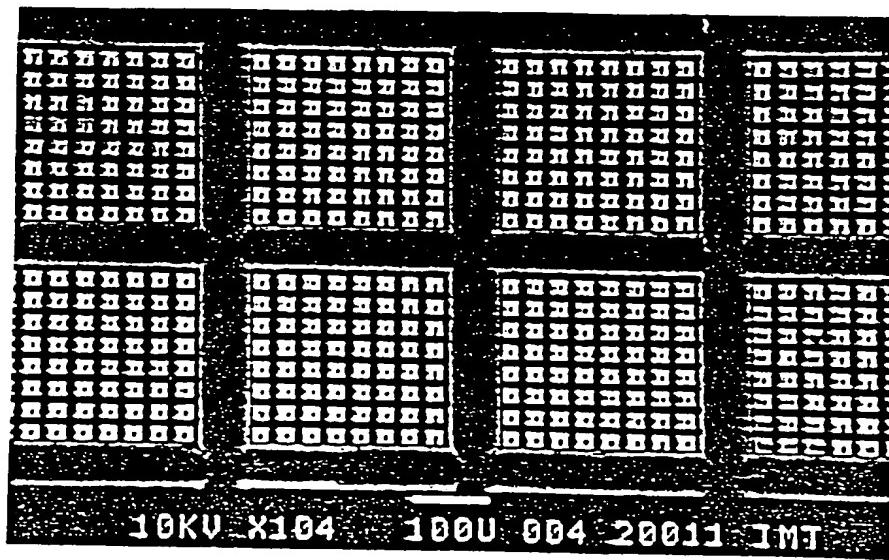


Fig. 5



Nummer:  
Int. Cl.<sup>6</sup>:  
Offenlegungstag:

**DE 41 32 379 A1**  
**C 12 M 3/00**  
8. April 1993

Fig. 6

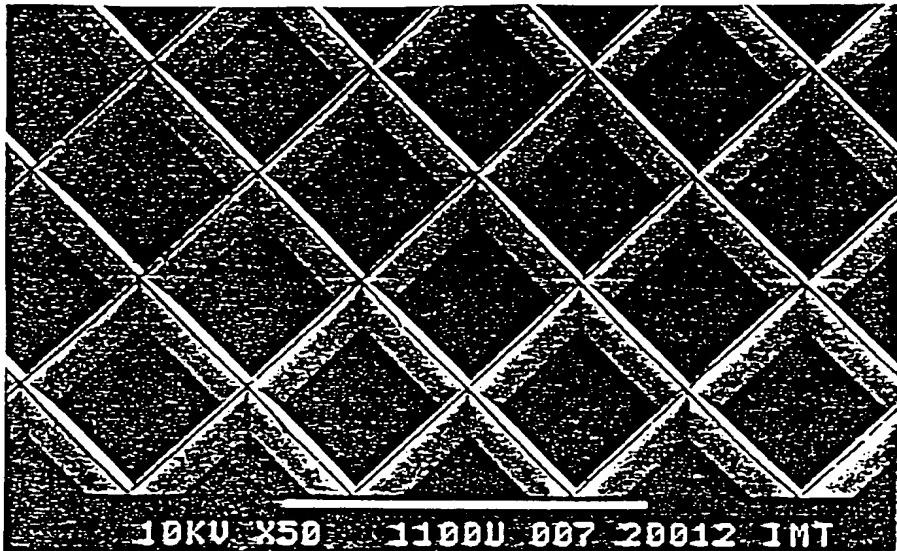
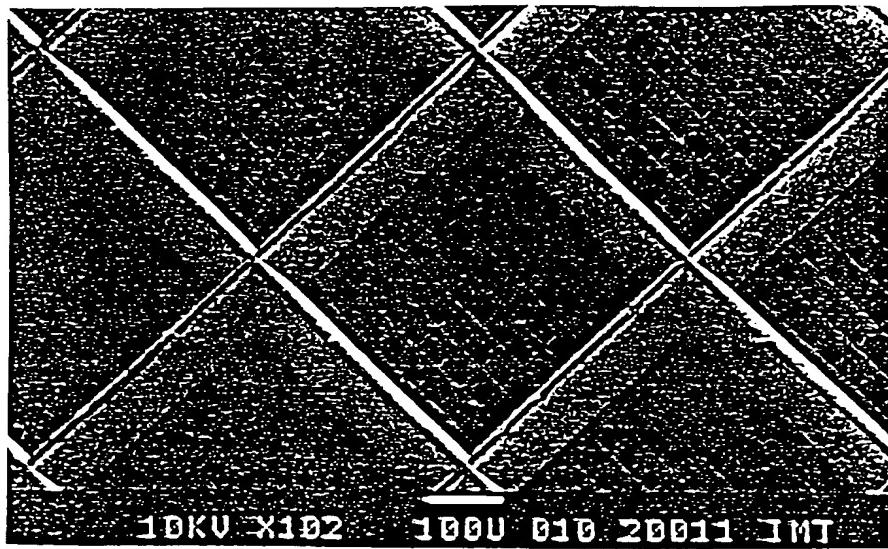


Fig. 7



Nummer:

DE 41 32 379 A1

Int. Cl.<sup>5</sup>:

C 12 M 3/00

Offenlegungstag:

8. April 1993

Fig. 8

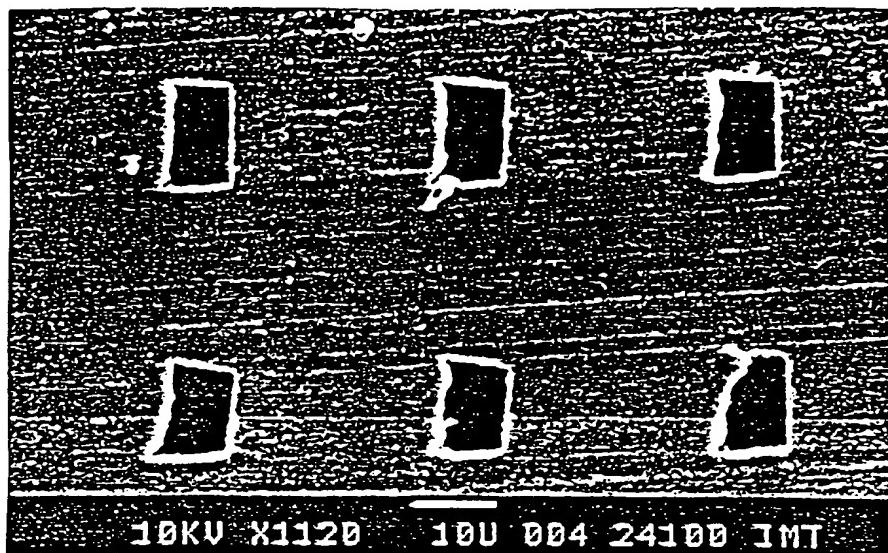


Fig. 9

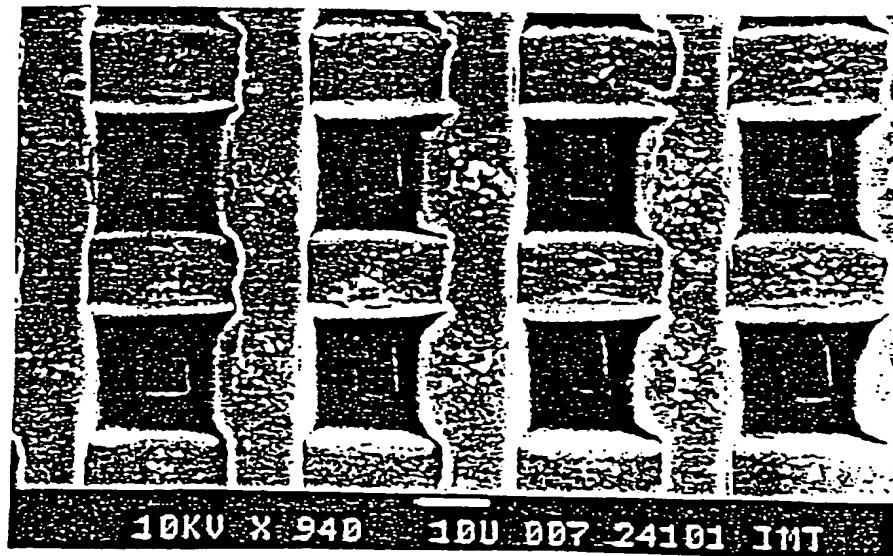


Fig. 10

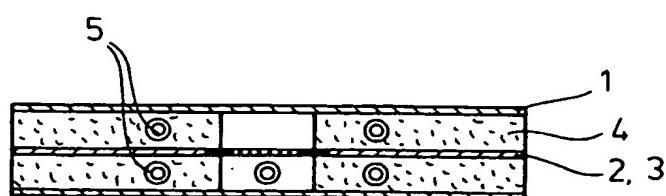
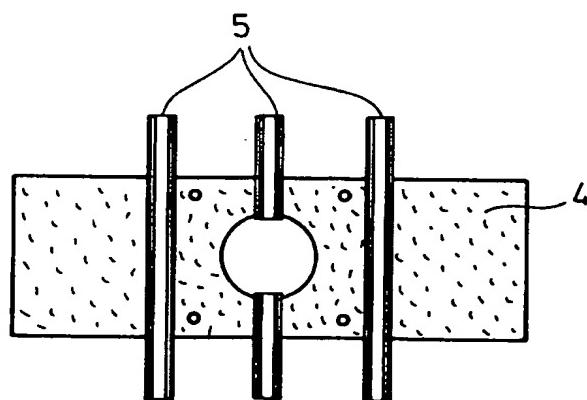
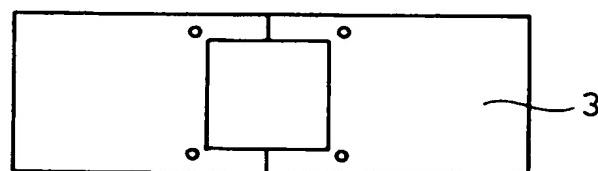
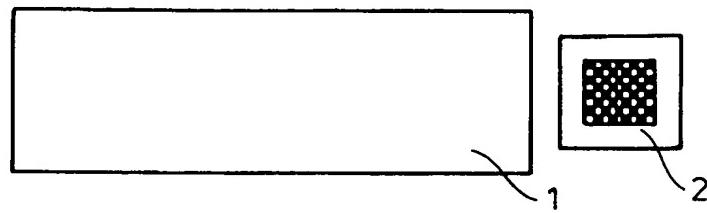


Fig. 11

